

[文章编号] 1000-8861(2009) 05-0591-05

人死亡受体 5 全长基因的构建及转染胶质瘤细胞

庄国洪^{1, 2#}, 黎之静^{2Δ}, 孟庆宇², 陈彩霞², 王 娟², 李文珠², 张佳锴², 朱 迅^{1*}

[摘 要] 目的 构建人死亡受体 5 (death receptor 5 DR5) 全长基因真核细胞表达载体 pcDNA3.1/DR5, pcDNA3.1/GFP/DR5 并观察其转染胶质瘤细胞 U138 的效果。方法 通过重叠 PCR 获得 DR5 全长编码序列, 构建 pcDNA3.1/GFP/DR5, pcDNA3.1/DR5 表达载体, 利用脂质体转染试剂盒, 分别将 2 种质粒 pcDNA3.1/GFP/DR5, pcDNA3.1/GFP 共转染胶质瘤细胞 U138 转染后 72 h 半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 DR5 mRNA 的表达, 流式细胞术检测 DR5 的表达强度、检测 Anti-DR5 对胶质瘤细胞 U138 生长的影响。结果 获得了 DR5 全长编码序列, 成功瞬时转染 U138, RT-PCR、流式细胞术检测结果表明, 转染后 U138 细胞 DR5 mRNA、蛋白水平的表达明显增加, Anti-DR5 可以明显抑制 U138 细胞的生长。结论 获得了 DR5 全长编码序列, 探索到成功转染 DR5 的最佳方法, 为稳定筛选高表达 DR5 的 U138 细胞提供依据。

[关键词] 胶质瘤; 转染; DR5 基因构建
[中图分类号] Q782 [文献标志码] A

Construction of full-length DR5 gene and its transfection into glioma cell line

ZHUANG Guohong LI Zhijing MENG Qingyu CHEN Caixia WANG Juan LIWenzhu ZHANG Jiakai ZHU Xun
Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China

[Abstract] Objective To construct two eukaryotic expression vectors of human DR5 full length gene which named pcDNA3.1/DR5 and pcDNA3.1/GFP/DR5, and observe the transfection efficiency after transfecting them into glioma cell line U138. Methods Full-length DR5 gene was constructed by using overlapping PCR techniques, for constructing recombinant plasmids of pcDNA3.1/DR5 and pcDNA3.1/GFP/DR5. Utilizing liposome transfection, pcDNA3.1/DR5 and pcDNA3.1/GFP/DR5 recombinant were transduced into U138, respectively. The levels of DR5 mRNA were determined 72 h post transfection by relative quantitative RT-PCR, while the expressions of DR5 in U138 cell were detected by flow cytometry method. Results The full-length DR5 gene was constructed successfully. The eukaryotic expression vectors pcDNA3.1/DR5 and pcDNA3.1/GFP/DR5 were transfected into U138, respectively. The expression levels of DR5 mRNA and protein were significantly increased after transfection. Anti-DR5 could induce U138 apoptosis obviously. Conclusion The optimized transfection method of DR5 gene would provide the basis for stably screening high-level expression of DR5 in U138 cells.

[Key words] glioma cell; transfection; death receptor 5 gene construction

死亡受体 5 (death receptor 5 DR5) 是肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis inducing ligand TRAIL) 的特异性、高亲和力受体之一, 与 TRAIL 结合后可有效激活细胞内信号转导途径, 诱导细胞发生凋亡反应^[1]。现有的研究表明, DR5 在肺癌、胃肠道肿瘤、脑恶性胶质瘤、胰腺癌、肝癌等恶性肿瘤组织中都有不同程度的表达^[2]。Kwon 等^[3]报导过氧化氢 (H₂O₂) 通过上调 DR5 的表达增强人星形胶质细胞对 TRAIL 诱导其凋亡的敏感性。Cao 等^[4]研究发现通过缺氧/复氧途径可

以上调 DR5 的表达以增强 TRAIL 诱导肝癌细胞凋亡的作用。现有研究提示抗 DR5 单克隆抗体与 IL-21 或抗 CD40 和抗 CD137 单克隆抗体联合应用具有协同抗肿瘤作用^[5-6]。死亡受体 5 是肿瘤生物治疗的重要靶点, 以死亡受体为靶点的肿瘤生物治疗已成为研究热点^[7]。

我们前期已经成功构建 DR5 胞外段基因, 表达、纯化到 DR5 胞外段蛋白质。本实验将采用重叠 PCR 方法获得人死亡受体 5 的跨膜段、胞内段基因序列, 构建 DR5 全长基因序列的真核表达载体并转染胶质瘤细胞 U138, 这将为进一步研究死亡受体 5 的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 感受菌 *E. coli* DH5α 菌株、重组质粒 pcDNA3.1/DR5 (DR5 包外段) 由本室保存, 质粒 pcDNA3.1/GFP 由吉林大学李桂英博士惠赠。引物

作者单位: 1 吉林大学基础医学院免疫教研室; 2 厦门大学医学院抗癌研究中心
收稿日期: 2008-09-27 修回日期: 2008-11-21
#现在厦门大学医学院抗癌研究中心工作
Δ 同为第一作者
* 通信作者: 朱 迅, 吉林大学基础医学院免疫教研室, 长春 130021
Tel 0431-85619476 E-mail zhuxun@sohu.com

由上海生工公司合成。限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶及 Pfu DNA 聚合酶为 NEB 公司产品。质粒提取及胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。抗 DR5 鼠单克隆抗体由本室制备,人神经胶质瘤细胞株 U138 由加拿大阿尔博塔大学郝春海博士提供。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体由厦门波生公司惠赠。

表 1 DR5 胞内段引物

Tab 1 Primers of intracellular domain of DR5

Order	Primer	Products/(bp)
A7→A5→A1→	F1 5' CCGTAGTCTTGATTGTGGCTGTGTTTGTGTTGCAAGTCTTTACTG	3' 166
	TGGAAGAAAGTCCTTCTCTACCTGAAAGGCATC	
	R2 5' CTCACGATCTCATTGAGGACATTGTCCTCAGCCCCAGGTCG	3'
	TTGTGAGCTTCTGTCCACACGCTCAGGGTCCCCACCACCCTGAGCA	
A2→	F3 5' TCAATGAGATCGTGAGTATCTTGCAGCCACCCAGGTCCTGAGCA	3' 166
	GGAAATGGAAGTCCAGGAGCCAGCAGAGCCAACAGGTGTCAAC	
	R4 5' ACCAGCAGCCTCTCCTCTGAGACCTTTCAGCTTCTGCCGGTTCC	3'
	AGCAGATGCTCTGACTCCCCGGGGGACAACATGTTGACACCTGT	
A6→A3→	F5 5' TCTCAGAGGAGGAGGCTGCTGGTTCCAGCAAATGAAGGTGATCCCA	3' 166
	CTGAGACTCTGAGACAGTGCTTCGATGACTTTGCAGACTTGGT	
	R6 5' CCTCAGCTTTAGCCACCTTTATCTCATTGTCCATGAGGCCCAACTTCC	3'
	TCATGAGCGGCTCCAGGAGTCAAAGGGCACCAAGTCTGCA	
A4→	F7 5' GTGGCTAAAGCTGAGGCAGCGGGCCACAGGGACACCTTGTACCGA	166
	TGCTGATAAAGTGGGTCAACAAAACCGGGCGAGATGCCTCTGT	
	R8 5' AGCTCAACAAGTGGTCCTCAATCTTCTGCTTGGCAAGTCTCTCTCCCA	3'
	GCGTCTCCAAGGCATCCAGCAGGGTGTGGACAGAGGCATCT	
F9	5' ACCACTTGTGAGCTCTGGAAGTTCATGTATCTAGAA	3' 106
	GGTAATGCAGACTCTGCCATGTCC	

Underlined part represents repeated gene sequence of each passage.

1.3 DR5表达载体的构建 PCR 扩增产物及质粒分别用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I 消化,胶回收。在 T₄ DNA 连接酶催化下,将 DR5 全长基因克隆至质粒 pDNA3.1、pDNA3.1/GFP 中,构建成重组质粒 pDNA3.1/DR5、pDNA3.1/DR5/GFP,转化 *E. coli* DH5 α 。重组子进行菌液 PCR 鉴定、酶切鉴定,阳性克隆送上海博亚公司测序。

1.4 细胞培养及转染 以 pDNA3.1/GFP/DR5 作为转染的质粒,按 Lipofectam in 2000 试剂盒操作程序,略加改良,进行脂质体法基因转染^[8]。将 DR5 基因转染至胶质瘤细胞 U138。空 pDNA3.1/GFP 质粒转染作为对照。U138 细胞用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、100 μ g/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素)于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱内培养,当细胞生长至 80% 融合时传代。在转染前 1 天将对数生长期细胞以 1 \times 10⁵ 接种于 24 孔板,使细胞在转染时有 80% ~ 90% 汇合度。转染期间使用无抗生素的

1.2 DR5 全长基因的获得 从 NCBI 上查得 DR5 cDNA 胞内段序列,将其分成 9 个长引物片段分别合成,每对引物有 12 个碱基互补,通过重叠 PCR 拼接到 DR5 胞外段序列,引入 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点。反应条件均为: 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环数为 30 (表 1)。

培养基。分别按照质粒 0.8 μ g、脂质体为 0.8 ~ 1.6 ~ 2.4 μ L 的条件转染 U138 细胞。转染步骤遵循 Lipofectam in 2000 的使用说明进行。于转染后 36 h 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

1.5 转染 pDNA3.1/GFP/DR5 后 U138 细胞的鉴定

1.5.1 GFP 表达的检测 荧光显微镜下紫外光激发观察 GFP 表达。以转染 pDNA3.1 空载体组为对照组。

1.5.2 RT-PCR 检测 DR5 基因的表达^[9] 各取 1 \times 10⁷ 个转染 pDNA3.1/GFP/DR5 的 U138 细胞、未转染正常 U138 细胞。采用 Trizol 试剂一步法提取细胞总 RNA,以磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 为内参照,行 RT-PCR 技术检测。逆转录反应按试剂盒 (美国 Invitrogen 公司产品) 说明书操作。上游引物: 5'-GGTCGGGCAATTCTGAATT-3', 下游引物:

5'-GGGAATTACAAAGTGCACCG-3'。上述引物全部由上海生工公司合成。最后取 5 μ L PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果,观察 PCR 产物的大小。

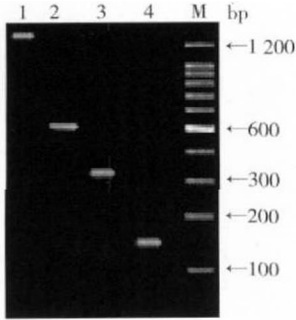
1.5.3 流式细胞仪检测转染后 DR5 蛋白表达 收获转染后 U138 细胞计数,取 1×10^6 细胞,生理盐水洗 2 遍,弃去上清,加入生理盐水 100 μ L 重悬细胞。加入 PE 荧光标记抗体 1 μ L,避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,另有一管细胞不加抗体,作为阴性对照。

1.5.4 流式细胞仪检测 Anti-DR5 对胶质瘤细胞 U138 生长的影响:将用 40.0 μ g/mL Anti-DR5 作用于转染前后的 U138,12 h 后收集,用 FACS 洗 2 遍,用 75% 的冰乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜;1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,柠檬酸缓冲液 (pH 7.4) 处理 15 min 后 300 目尼龙网过滤,1 000 r/min 离心 10 min,加入 100 μ L PI 染色液染色 30 min,上机检测,应用专用的 DNA 拟合软件处理数据后获得 DNA 含量周期分布及凋亡情况。

1.6 统计学方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料的组间显著性检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 DR5 全长基因编码序列的重组 经重叠 PCR 将 9 个长引物片段拼接成 DR5 的胞内段基因序列。第一步 PCR 反应: F1+ R2, F3+ R4, F5+ R6, F7+ R8 分别生成产物 A1, A2, A3, A4; 第二步 PCR 反应: A1+ A2, A3+ A4 分别生成产物 A5, A6; 第三步 PCR 反应: A5+ A6 生成产物 A7; 第四步 PCR 反应: A7+ F9 生成产物 A8, 即带有酶切位点的 DR5 胞内段序列; 同时将 DR5 胞外段和跨膜段序列、胞内段同样的方法拼,最后得到 DR5 的全长基因编码序列。图 1 的 1~4 泳道中分别可见 1 233, 628, 320, 166 bp 的产物带, 均与理论值相符。



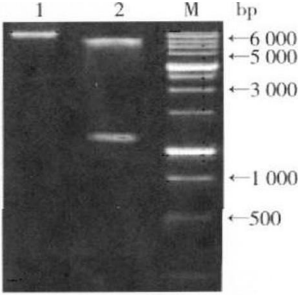
M) DNA markers 1) DR5 (1 233 bp); 2) A7 (628 bp); 3) A5 (320 bp); 4) A1 (166 bp).

图 1 PCR 产物电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis (1.7%) of PCR products

2.2 重组质粒的鉴定 重组子利用通用引物和 DR5 特异引物进行 PCR 鉴定,阳性的克隆提取质粒经 NcoI 及 XhoI 酶切后,琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到 2 条目的条带,分别为 DR5 条带 (1 226 bp)、

pcDNA3 1/DR5/GFP 条带 (5 482 bp) (图 2)。阳性克隆送上海博亚公司测序,测序结果表明获得一正确序列的重组子。



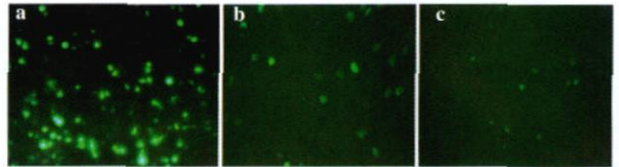
1) pcDNA3 1/GFP/DR5 2) pcDNA3 1/GFP/DR5 DR5 (1 226 bp); M) DNA markers

图 2 重组 pcDNA3 1/GFP/DR5 质粒的双酶切鉴定

Fig 2 Identification of recombined pcDNA3 1/GFP/DR5 by double enzyme digestion

2.3 pcDNA3 1/GFP/DR5 真核表达质粒鉴定 pcDNA3 1/GFP/DR5 重组质粒测序结果表明,插入序列包含 Gen-Bank 检索到的人 DR5 (AF016849) 全长基因序列,无任何密码子突变、缺失,序列插入方向正确。

2.4 荧光显微镜观察质粒转染真核细胞的 GFP 表达 我们对 U138 细胞进行了转染试验。当质粒 (μ g) 脂质体 (μ L) 比例为 1:1, 1:2, 1:3 时,36 h 细胞都有绿色荧光蛋白表达。其中以 1:3 比例时转染细胞效率最高,1:2 比例转染次之,1:1 比例转染效率最低 (图 3)。



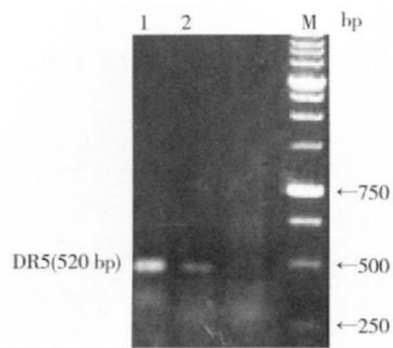
a) 1:3 (plasmid:LPS); b) 1:2 (plasmid:LPS); c) 1:1 (plasmid:LPS).

图 3 荧光显微镜下 pcDNA3 1/GFP/DR5 转染的 U138 细胞 ($\times 200$)

Fig 3 U138 cell observed by fluorescence after pcDNA3 1/GFP/DR5 transfection ($\times 200$)

2.5 RT-PCR 的方法检测 DR5 mRNA 的表达 通过 RT-PCR 检测 DR5 mRNA 在转染前后 U138 细胞的表达情况。结果提示 DR5 mRNA 在转染前后的表达情况不同,其中转染 pcDNA3 1/GFP/DR5 72 h 后 DR5 mRNA 在 U138 中表达明显提高,DR5 mRNA 表达在 502 bp 电泳结果与设计引物扩增片段相符 (图 4)。

2.6 流式细胞仪检测转染后 U138 细胞 DR5 蛋白表达 以 pcDNA3 1/GFP/DR5 利用脂质体介导法转染 U138 细胞 72 h 后,用 FCM 检测 U138 细胞上 DR5 的表达。结果显示,瞬时转染 pcDNA3 1/GFP/DR5 可显著上调 DR5 在胶质瘤细胞上的表达,转染后的表达明显高于转染前 (表 2)。



1) transfected U138; 2) U138 M; M) DNA marker

图 4 RT-PCR 检测 DR5 mRNA 的表达

Fig 4 mRNA expression of DR5 measured by RT-PCR

表 2 胶质瘤细胞 U138 上 DR5 的表达

Tab 2 The expression of DR5 on glioma cells U138

Cell Line	DR5 expression %	
	Before transfection	After transfection
U138	22.0	89.9

2.7 流式细胞仪检测转染后 Anti-DR5 对胶质瘤细胞 U138 生长的影响 如表 3 显示, 与对照组相比, 采用 40.0 μg/mL 的 Anti-DR5 处理 U138 细胞 12 h 后, 细胞出现显著的凋亡峰。U138 细胞凋亡指数从 (4.2 ± 5.3)% 上升到 (76.2 ± 2.1)%, G₀/G₁ 期细胞比例增加, 而 G₂/M 期细胞比例则明显减少 ($P < 0.05$, 表 3), 说明 Anti-DR5 能使 U138 细胞停留在 G₁ 期, 推迟进入 S 期, 抑制细胞生长并诱导细胞发生凋亡。

表 3 Anti-DR5 对 U138 细胞周期、凋亡的影响

Tab 3 Effects of Anti-DR5 on cell cycle and apoptosis of U138 cells (%)

Cell apoptotic index	U138	U138 + Anti-DR5	
		Before transfection	After transfection
A1	4.2 ± 5.3	20.7 ± 1.43	76.2 ± 2.1
G ₀ /G ₁	24.6 ± 5.3	33.5 ± 2.9	13.6 ± 1.5
S	9.9 ± 4.8	8.3 ± 3.6	6.8 ± 2.3
G ₂ /M	61.3 ± 2.5	37.5 ± 4.2	3.4 ± 1.6

3 讨论

我们前期已报道^[10], 抗 DR5 mAb 不需要交联即可能不同程度地诱导 3 株胶质瘤细胞 U343、U138、U373 凋亡。其中, U343 细胞对抗 DR5 mAb 诱导的凋亡较敏感, 其次是 U138 细胞; 而 U373 细胞则对该抗体的处理表现为耐受。3 株神经胶质瘤细胞株上 DR5 的表达量从高到低, 依次是 TRAIL 敏感株 U343、部分敏感株 U138 和耐受株 U373。实验结果提示, 抗 DR5 mAb 诱导细胞凋亡的作用与细胞表面 DR5 的表达水平有一定的关系。

文献 [11] 证实 U343 细胞高表达 DR5 (86.5%), EMU1.5 (第四军医大学制备的抗 DR5

mAb) 40 μg/mL 可诱导 77.33% U343 细胞凋亡。U138 细胞低表达 DR5 (22.0%), EMU1.5 40 μg/mL 可诱导 20.75% U138 细胞凋亡。U373 细胞低表达 DR5 (2.61%), 40 μg/mL EMU1.5 可诱导 8.9% U373 细胞凋亡, 这说明 EMU1.5 TRAIL 的凋亡诱导作用与细胞表面 DR5 的表达相关。

亚毒性剂量的 doxo 和 5-Fu 可使对 mAb EMU1.5 不敏感的 U138 细胞转变为敏感株, 其机制可能是由于提高细胞表面 DR5 的表达来实现的, 从而提高 mAb EMU1.5 诱导 U138 细胞凋亡的效应^[11]。

Song 等^[12]报导 ABT-737 与 TRAIL 联合应用可以大大诱导肾、前列腺、肺癌等多种肿瘤细胞死亡, ABT-737 提高 TRAIL 作用的敏感性与 TRAIL 受体, DR5 的表达上调相关, 特殊 DISC 复合物水平提高, 而 e-FLIP, FADD, 和 caspase-8 的表达没有改变。

以上研究提示, DR5 是诱导肿瘤细胞凋亡的重要靶点, 通过提高 DR5 的表达可以改变肿瘤细胞对凋亡诱导剂的敏感性。所以, 我们构建 pdDNA3.1/GFP/DR5 重组体, 并转染 U138 细胞, 经过 RT-PCR、FCM 分析发现转染后 U138 细胞 DR5 的 mRNA、蛋白水平的表达都有明显提高, 可以说明瞬时转染 pdDNA3.1/GFP/DR5 成功。通过 FCM 分析 Anti-DR5 对 U138 生长的影响发现, 应用 40.0 μg/mL 的 Anti-DR5 处理 U138 细胞 12 h 后, 细胞出现显著的凋亡峰。U138 细胞凋亡指数从 (4.2 ± 5.3)% 上升到 (76.2 ± 2.1)%, 与 Anti-DR5 诱导 U343 细胞凋亡的效果相似, 而 U343 本身高表达 DR5, 这也说明 DR5 表达上调是提高抗体诱导细胞凋亡能力的基础。故提高 DR5 的表达对于进一步研究凋亡发生的机制、肿瘤治疗有重要意义。

本实验通过重叠 PCR 获得完整的 DR5 全长基因序列 (1226bp), 并成功构建 pdDNA3.1/GFP/DR5 重组体, 经测序证实了得到正确的 DR5 全长基因序列。通过转染试验确立了最适转染条件, 并成功瞬时转染了胶质瘤细胞 U138。通过提高 U138 细胞 DR5 的表达增强了 Anti-DR5 诱导其凋亡的能力。

[参考文献]

[1] Walczak H, Degli Esposti MA, Johnson RS et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL [J]. EMBO J. 1997, 16(17): 5386-5397.
[2] Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN et al. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL [J]. Curr Biol. 1997, 7(9): 693-696.
[3] Kwon D, Choi D, Choi C, et al. Hydrogen peroxide enhances TRAIL-induced cell death through up-regulation of DR5 in human astrocytic cells [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2008, 372(4): 870-874.
[4] Cao L, Li Y, Cheng F, et al. Hypoxia/reoxygenation up-regulated the expression of death receptor 5 and enhanced apoptosis in human hepatocyte line [J]. Transplant Proc.

38 (7): 2207-2209

[5] Kem MA, Haugg AM, Koch AE, et al Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2006, 66 (14): 7059-7066

[6] Sbot AM, Tur V, Szegezdi E, et al Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (23): 8634-8639

[7] Park SJ, Wu CH, Choi MR, et al P-glycoprotein enhances TRA IL-triggered apoptosis in multidrug resistant cancer cells by interacting with the death receptor DR5 [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72 (3): 293-307

[8] 崔 激, 郝淑维, 李保红, 等. IL-18 基因转染对小鼠卵巢 OVHM 细胞免疫生物学特性的影响 [J]. 免疫学杂志, 2008, 24(4) 456-458

[9] 李文珠, 李 迎, 胡庆冬, 等. 诱骗受体 DcR3 对佐剂型关节炎大鼠模型的作用分析 [J]. 免疫学杂志, 2008, 24 (1): 23-28

[10] 庄国洪, 张长弓, 陶惠然, 等. 抗死亡受体单克隆抗体诱导胶质瘤细胞凋亡的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(12): 1110- 1114

[11] 庄国洪, 宋玉国, 毕胜利, 等. 阿霉素提高抗死亡受体单克隆抗体诱导胶质瘤细胞凋亡的研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(2): 120-123

[12] Song JH, Kandasamy K, Kraft AS. ABT-737 induces expression of the death receptor 5 and sensitizes human cancer cells to TRA IL-induced apoptosis [J]. J Biol Chem, 2008, 283(36): 25003-25013

(编辑 李海鸥)

(上接第 590 页)

蛋白分子的空间结构归根结底是一级结构决定的。我们从蛋白质的一级结构入手, 在融合蛋白中引入富含甘氨酸的短肽 (GSGGGSG), 此柔性短肽由不带电荷的中性小氨基酸组成, 避免短肽内部形成复杂的二级结构, 保证其伸展状态, 两端的极性氨基酸 (Ser) 增加柔性肽的水溶性。并用两个赖氨酸组成的 K-K 结构分隔 3 段 B 细胞表位, 防止表位间形成新的抗原表位。同时, 运用分子建模技术对抗原的结构进行分析, 确定柔性短肽两端的蛋白质功能区能独自发挥自己的作用。

重组后的融合质粒 pVAX1-IL-4 /SYN-B 在 PD 小鼠模型中是否具有较好的治疗和预防作用, 我们正在进行下一步的实验研究。

[参考文献]

[1] Benner EJ, Mosley RL, Destache CJ, et al Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(25): 9435-9440

[2] Kurkowska-Jastrzebska I, Bal kowie-Iskra E, Joniec I, et al Immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein and complete Freund adjuvant partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced damage in mouse model of Parkinson's disease[J]. Neuroscience, 2006, 131(1): 247-254

[3] Masliah E, Rockenstein E, Adame A, et al Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Neuron, 2005, 46(6): 857-868

[4] Lemere CA, Maier M, Jiang L, et al Amyloid-beta immunotherapy for the prevention and treatment of Alzheimer disease: lessons from mice, monkeys, and humans[J]. Rejuvenation Res, 2006, 9(1): 77-84

[5] 王加才, 王少君, 彭国光. hα-syn 蛋白核酸疫苗 PVAX1-hα-s1-140 的构建及其表达 [J]. 重庆医学, 2008, 37(17): 1480-1482

[6] Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2 (7): 492-501.

[7] Galvin JE, Lee VM, Trojanowski JQ. (2001) Synucleinopathies: clinical and pathological implications[J]. Arch Neurol, 2001, 58 (2): 186-190

[8] Clayton DE, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease [J]. Trends Neurosci, 1998, 21(6): 249-254

[9] Ueda K, Fukushima H, Masliah E, et al Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(23): 11282-11286

[10] Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain[J]. FEBS Lett, 1994, 345(1): 27-32

[11] Lee CH, Kim HJ, Lee JH, et al Dequalinium-induced protofibril formation of alpha-synuclein[J]. J Biol Chem, 2006, 281(6): 3463-3472

[12] Caughey B, Lansbury PT. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders[J]. Annu Rev Neurosci, 2003, 26: 267-298

[13] Sepell LC, Berriman J, Jakes R, et al Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(9): 4897-4902

[14] Chen M, Margittai M, Chen J, et al Investigation of alpha-synuclein fibril structure by site-directed spin labeling[J]. J Biol Chem, 2007, 282(34): 24970-24979

[15] Windisch M, Wolf HJ, Hutter-Paier R, et al. Is alpha-synuclein pathology a target for treatment of neurodegenerative disorders? [J]. Curr Alzheimer Res, 2007, 4(5): 556-561.

[16] 王彤钢. 白细胞介素 4 生物学功能研究进展 [J]. 国外医学免疫学分册, 1994, 1: 13-17.

[17] 郑风荣, 刘洪展, 孙修勤. DNA 疫苗的分子佐剂研究进展及其在鱼用疫苗中应用 [J]. 免疫学杂志, 2006, 22 (3): 73-75.

(编辑 朱健利)